

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 348 641  
A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 89108451.9

(51)

Int. Cl. 4: **C07D 475/04**

(22)

Anmeldetag: 11.05.89

Patentanspruch für folgenden Vertragsstaat: GR  
+ ES

(30)

Priorität: 29.06.88 DE 3821875

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
03.01.90 Patentblatt 90/01

(84)

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: **EPROVA Aktiengesellschaft**  
**Im Laternenacker 5**  
**CH-8200 Schaffhausen(CH)**

(72)

Erfinder: **Müller, Hans Rudolf**  
**Beckenwäldli 18**  
**CH-8207 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Ulmann, Martin**  
**Steigstrasse 339**  
**CH-8447 Dachsen(CH)**  
Erfinder: **Conti, Josef**  
**Winkelriedstrasse 22**  
**CH-8203 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Mürdel, Günter**  
**vor Hegin**  
**D-7708 Tengen-Büßlingen(DE)**

(54)

Verfahren zur Herstellung von Tetrahydrofolaten.

(57)

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von 5,10-Methenyl-(6R)-, 5-Formyl-(6S)- und/oder 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Säureadditionssalz oder das innere Salz von 5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure einer Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation unterzieht und, falls erwünscht, die erhaltene 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure durch Behandeln mit einem hydrolisierenden Mittel in 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder durch Behandeln mit einem reduzierenden Mittel in 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure umwandelt und/oder eine erhaltene freie Säure durch Behandeln mit einer Base in eines ihrer Salze überführt.

**EP 0 348 641 A2**

## Verfahren zur Herstellung von Tetrahydrofolaten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure [5,10-CH-(6R)-THF; "(6R)-I"], von biologisch aktiven Tetrahydrofolaten, insbesondere von 5-Formyl- [5-CHO-(6S)-THF] und 5-Methyl-(6S)-THF] und 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure [5-Me-(6S)-THF] sowie von deren Salzen, insbesondere deren physiologisch gut verträglichen Calcium-, Magnesium-, Natrium- und Kaliumsalzen.

Die genannten (6S)-Tetrahydrofolate [(6S)-5,6,7,8-Tetrahydropteroyl-L-glutamate] sind die ausreichend stabilen natürlichen biologisch aktiven Formen der Folsäure (Folsäure Cofaktoren).

5-CHO-(6S)-THF ist der Citrovorum-Faktor (= Wachstumsfaktor für *Leuconostoc citrovorum*).

Im Organismus wird 5-CHO-(6S)-THF über 5,10-Methylen-(6R)-THF in 5-Me-(6S)-THF umgewandelt.

Tetrahydrofolate enthalten 2 asymmetrische Zentren. Bei ihrer Synthese aus Folsäure [N-(Pteroyl)-L-glutaminsäure] liegt das im Glutaminsäure-Rest enthaltene chirale C-Atom in der L-Form vor, während das durch Hydrierung der Doppelbindung in 5,6-Stellung des Pteroyl-Restes entstandene chirale C-Atom in Position 6 [C(6)] in der racemischen, der (6R,S)-Form, vorliegt. Synthetische Tetrahydrofolate bestehen demnach jeweils aus einer 1:1-Mischung von zwei Diastereomeren.

Im natürlichen Vorkommen, z.B. in der Leber, findet man die Tetrahydrofolate nur in der einen diastereomeren Form, wobei die 5-CHO-THF als 5-CHO-(6S)-THF und die 5-Me-THF als 5-Me-(6S)-THF vorliegt.

Die absolute Konfiguration an C (6) der natürlichen Tetrahydrofolsäure ist nach J.C. Fontecilla-Camps et al., J. Amer. chem. Soc. 101 (20), 6114/5 (1979) gemäss der Sequenz-Regel mit S zu spezifizieren und diejenige an C (6) der natürlichen 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure und der 5,10-Methenyl-tetrahydrofolsäure mit R: R. Kalbermatten et al., Helv. Chim. Acta 64 (8), 2627 (1981), Fussnote 4.

5-CHO-(6R,S)-THF (Folinsäure), wird in Form ihres Calciumsalzes (Leucovorin) als Arzneimittel verwendet zur Behandlung von megaloblastischer Folsäuremangel-Anämie, als Antidot zur Verstärkung der Verträglichkeit von Folsäure-Antagonisten speziell von Aminopterin, Methotrexat und Fluoruracil in der Krebstherapie ("leucovorin rescue") und der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis und rheumatischer Arthritis sowie zur Verstärkung der Verträglichkeit von bestimmten Antiparasitika, etwa Trimethoprim-Sulfamethoxazol, in der Chemotherapie. Calcium-5-methyl-(6R,S)-tetrahydrofolat findet eine ähnliche Verwendung.

Nach Verabreichung von 5-CHO-(6R,S)-THF wird der (6S)-Anteil dieser Diastereomeren-Mischung rasch in 5-Me-(6S)-THF umgewandelt, während der (6R)-Anteil nicht metabolisiert wird: J.A. Straw et al., Cancer Research 44, 3114-3119 (1984).

5-CHO-(6R)-THF hemmt zudem einige für den C<sub>1</sub>-Transfer verantwortliche Enzyme und damit die biochemische Wirkung der Tetrahydrofolate: R.P. Leary et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 484 (1973); V.F. Scott et al., ibid. 14, 523 (1964); G.K. Smith et al., Biochemistry, 20, 4034 (1981). Die Verwendung von (6S)-Tetrahydrofolaten anstelle von (6R,S)-Tetrahydrofolaten müsste daher auch therapeutische Vorteile aufweisen.

Es besteht darum ein Bedürfnis, die bisher verwendeten Mischungen von Diastereomeren, enthaltend jeweils die (6S)- und (6R)-Form, durch die natürliche (6S)-Form zu ersetzen.

Es sind mehrfach Anstrengungen zur Trennung von (6R,S)-Tetrahydrofolsäuren und zu deren asymmetrischer Synthese und Isolierung der physiologisch aktiven Formen unternommen worden.

D. Cosulich et al., J. Amer. chem. Soc. 74, 4215-16 (1952), US-PS 2.688.018 (31.08.1954) haben beispielsweise versucht, die Trennung durch fraktionierte Kristallisation eines Erdalkalisalzes, z.B. des Calcium- oder Strontiumsalzes der 5-CHO-(6R,S)-THF aus wässriger Lösung zu bewerkstelligen (siehe auch J.C. Fontecilla-Camps et al., J. Amer. chem. Soc. 101, 6114 (1979)).

Unter den von D. Cosulich et al. offenbarten Bedingungen lässt sich die gewünschte Trennung nicht realisieren. Bei der Kristallisation z.B. des Calciumsalzes von 5-CHO-(6R,S)-THF aus Wasser bei pH 7-8 wird immer wieder die 6R,S-Form erhalten, wie sich mittels chromatographischer Analyse an einer chiralen HPLC-Säule sowie anhand der optischen Drehung quantitativ nachweisen lässt. Dabei ist es unerheblich, ob man rohes oder reines Calciumsalz von 5-CHO-(6R,S)-THF zur Kristallisation einsetzt; stets wird die (6R,S)-Form zurückerhalten. Eine Trennung und Anreicherung der (6S)-Form kann auch nicht erreicht werden, wenn man die übersättigte wässrige Lösung eines Erdalkalisalzes von 5-CHO-(6R,S)-THF mit authentischem Erdalkalisalz von 5-CHO-(6S)-THF impft.

Die Trennung der Diastereomeren-Paare wurde auch mittels Chromatographie versucht: J. Feeney et al., Biochemistry 20, 1837 (1981). Ausserdem wurden die (6S)-Isomeren hergestellt durch stereospezifische Reduktion von Dihydrofolaten in Gegenwart von Dihydrofolat-Reduktase: L. Rees et al., Tetrahedron 42, 117

(1986).

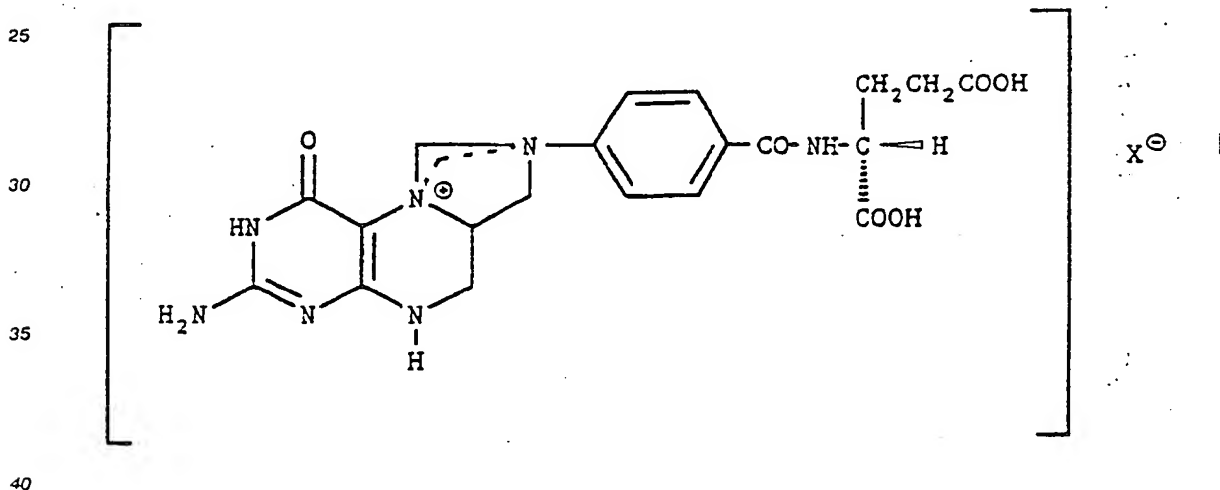
L. Rees et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1987, 470 und EP-A2-0.266.042, haben ein Trennverfahren für (6R,S)-THF beschrieben, mit dessen Hilfe 5-CHO-(6S)-THF und 5-CHO-(6R)-THF in geringen Mengen erzeugt werden konnten. Das Verfahren besteht darin, dass man (6R,S)-THF z.B. mit (-)-Menthylchloroformiat zu den diastereomeren 5-(-)-Menthylloxycarbonyl-tetrahydrofolsäuren umsetzt, diese durch wiederholte Behandlung mit n-Butanol trennt, die erhaltenen Diastereomeren mit einer gesättigten Lösung von Bromwasserstoff in einer Mischung aus Ameisensäure und Essigsäure erwärmt, wobei nach Hydrolyse 5-Formyl-(6S)- und -(6R)-THF gebildet werden, und schliesslich diese als Calciumsalze isoliert.

Dieses Verfahren ist umständlich und schwierig und benötigt zur Herstellung des chiralen Reagens hochgiftiges Phosgen. Zudem ist das Ausgangsmaterial (6R,S)-THF sehr unbeständig. Bei der Abspaltung der chiralen Hilfsgruppe mit HBr in AcOH bei  $> 50^{\circ}\text{C}$  wird ein Teil der Glutaminsäure abgespalten, und es entstehen Nebenprodukte, die sich nur schwierig abtrennen lassen. Die nach einem solchen Verfahren erzeugte (6S)-Folinsäure wäre so teuer, dass deren Anwendung anstelle der (R,S)-Tetrahydrofolate kaum in Betracht kommt.

Bis heute ist kein industriell brauchbares Verfahren zur Gewinnung von (6S)-Tetrahydrofolaten bekannt geworden.

Es bestand somit nach wie vor die Aufgabe, ein einfaches, industriell anwendbares Verfahren zur Herstellung von 5-CHO- und 5-Me-(6S)-THF zu finden.

5-CHO- und 5-Me-(6R,S)-THF können in bekannter Weise aus Folsäure hergestellt werden. Durch Formylierung mit Ameisensäure wird 10-Formyl-folsäure (10-CHO-FA) gebildet. Diese kann anschliessend katalytisch zu 10-Formyl-tetrahydrofolsäure (10-CHO-THF) hydriert werden. Durch Dehydratisierung ist daraus 5,10-Methenyl-tetrahydrofolsäure (1; 5,10-CH-THF; "Anhydro-leucovorin") erhältlich:



In dieser Formel ist  $X^{\ominus}$  ein Äquivalent eines beliebigen Anions, z.B.  $\text{Cl}^{\ominus}$  oder  $\text{Br}^{\ominus}$ . I kann auch in Form eines Säureadditionssalzes, z.B. des Chlorid-Hydrochlorids der Kurzformel  $(5,10\text{-CH-THF})^{\oplus}\text{Cl}^{\ominus}\cdot\text{HCl}$ , vorliegen. Aus dieser Form kann mit Hilfe eines Anionenaustauschers auch das entsprechende innere Salz erhalten werden (I,  $X^{\ominus}$  fehlt,  $\text{COO}^{\ominus}$  an Stelle von  $\text{COOH}$ ).

Aus I lassen sich die gewünschten Tetrahydrofolate leicht herstellen: Durch Hydrolyse (Transformylierung) erhält man 5-Formyl-tetrahydrofolsäure (5-CHO-THF), die als Calciumsalz (Leucovorin) isoliert werden kann: CH-PS 305.574 (CYANAMID). Durch Reduktion mit Natriumborhydrid erhält man die 5-Methyl-tetrahydrofolsäure (5-Me-THF; Mefolinsäure), die als Calcium- oder Magnesiumsalz isoliert werden kann: CH-PS 649.550 (EPROVA).

Es wurde nun überraschend gefunden, dass bei der fraktionierten Kristallisation von Lösungen von (6R,S)-I bzw. von dessen Salzen (6R)-I bzw. dessen Säureadditionssalze (der Kurzformel  $[5,10\text{-CH-(6R)-THF}]^{\oplus} X^{\ominus}\cdot\text{HX}$ ) bzw. dessen inneres Salz zur Kristallisation gebracht werden können, derart, dass der Gehalt des Kristallisates an (6R)-I bis zu mehr als 90% beträgt. (6R)-I seinerseits ist zur Herstellung der gewünschten Tetrahydrofolate gut geeignet: man erhält daraus 5-CHO-(6S)-THF durch Hydrolyse und 5-Me-(6S)-THF durch Reduktion.

Entscheidend ist also, dass man die Diastereomerentrennung auf der Stufe von I durchführt.

Das Gelingen dieser Auftrennung ist darum überraschend, weil Rees et al., J. Chem. Soc. Chem.

Commun. 1987, 470, zur Ermöglichung der Trennung ein zusätzliches chirales Zentrum in das THF-Molekül eingebaut und damit eine erhebliche Komplikation in Kauf genommen haben.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von 5,10-Methenyl-(6R)-, 5-Formyl-(6S)- und/oder 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man 5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure, dessen inneres Salz und/oder eines ihrer Salze mit starken Säuren einer Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation unterzieht und, falls erwünscht, die erhaltene 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure durch Behandeln mit einem hydrolysierenden Mittel in 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder durch Behandeln mit einem reduzierenden Mittel in 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure umwandelt und/oder eine erhaltene freie Säure durch Behandeln mit einer Base in eines ihrer Salze überführt.

Die erfindungsgemäße Diastereomeren-Trennung erfolgt vorzugsweise durch fraktionierte Kristallisation aus mindestens einem polaren Lösungsmittel.

Als polare Lösungsmittel kommen beispielsweise in Betracht: niedere aliphatische Carbonsäuren, insbesondere Ameisensäure sowie Essigsäure, flüssige wasserlösliche Amide wie Formamid, Dimethylformamid, Dimethylacetamid, 1-Methyl-pyrrolidon, 2-Piperidinon, 4-Formyl-morpholin, 1-Formyl-pyrrolidon, 1-Formyl-piperidin, Tetramethylharnstoff, Sulfoxide oder Sulfone wie Dimethylsulfoxid, Dimethylsulfon oder Sulfolan (Tetramethylensulfon), konzentrierte wässrige starke Säuren wie 20-35%-ige Salzsäure oder andere wässrige Mineralsäuren, wie beispielsweise Bromwasserstoffsäure, Jodwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure, oder Lösungen starker organischer Säuren wie von Oxalsäure, Maleinsäure, Trichloressigsäure, Trifluoressigsäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Toluolsulfonsäure, Camphersulfonsäuren. Ameisensäure wird bevorzugt.

Bevorzugt eignen sich jedoch Gemische der vorstehend angegebenen Lösungsmittel, insbesondere Gemische eines der angegebenen organischen "Lösungsmittel" mit einer wässrigen Mineralsäure oder mit Wasser ("Kristallisationsmittel").

Als Lösungsmittel kann auch eine konzentrierte wässrige Mineralsäure, beispielsweise konzentrierte Salzsäure und als Kristallisationsmittel eine geringe Menge Wasser verwendet werden. Wenn man dabei die Wassermenge derjenigen der Konzentrierten wässrigen Mineralsäure annähert oder gar gleichsetzt, so kristallisiert  $[5,10-(6R,S)\text{-THF}]^+X^- \cdot HX$  aus, d.h. eine Trennung erfolgt nicht. Bevorzugtes Lösungsmittel ist Ameisensäure und bevorzugtes Kristallisationsmittel eine wässrige starke Säure, insbesondere verdünnte Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, eine Sulfonsäure oder Salpetersäure. Anstelle einer wässrigen starken Säure kann als Kristallisationsmittel auch Eisessig verwendet werden.

Als Endprodukt erhält man in der Regel ein Säureadditionssalz des 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäuresalzes I mit der entsprechenden Säure HX. Versetzt man z.B. eine konzentrierte Lösung des Hydrochlorids von (6R,S)-I ( $X = Cl$ ) in Ameisensäure ("Lösungsmittel") mit wässriger konzentrierter Salzsäure ("Kristallisationsmittel"), so kristallisiert (6R)-I in Form des Chlorid-Hydrochlorids der Kurzformel  $[5,10\text{-CH-(6R)-THF}]Cl^+HCl^-$  mit einem (6R)-Anteil von etwa 90% aus. Dieser (6R)-Anteil kann durch nochmalige Umkristallisation, z.B. aus Ameisensäure/Salzsäure, gesteigert werden.

Analog erhält man z.B. das Hydrobromid von (6R)-I ( $X = Br$ ), wenn man eine Lösung des Hydrobromids von (6R,S)-I ( $X = Br$ ) oder des inneren Salzes von (6R,S)-I in Ameisensäure mit wässriger Bromwasserstoffsäure versetzt.

Säurekonzentration und Mengenverhältnisse von Lösungsmittel und Kristallisationsmittel können innerhalb weiter Grenzen variiert werden. Vorzugsweise liegt die Konzentration von 5,10-CH-(6R,S)-THF zwischen 10 und 40 Gew.%, das Verhältnis zwischen Lösungs- und Kristallisationsmittel zwischen 10:1 und 1:1. Die Säurekonzentration im Kristallisationsmittel kann zwischen 0 und 12 N liegen. In der Regel kann man höhere Ausbeuten bei geringerem Trennungseffekt erzielen, wenn man relativ viel Kristallisationsmittel verwendet; wird dagegen wenig Kristallisationsmittel eingesetzt, so ist der Trenneffekt besser, wobei allerdings die Ausbeute sinken kann. Abhängig von dem angestrebten Ziel, dem jeweiligen Ausgangsmaterial, Lösungs- und Kristallisationsmittel kann man das Optimum der Reaktionsbedingungen durch systematische Versuche ohne Schwierigkeiten bestimmen.

Geht man von einem Säureadditionssalz des Typs  $[5,10\text{-CH-(6R,S)-THF}]X^+HX^-$  aus, so kann die Diastereomerentrennung unter Bildung von  $[5,10\text{-CH-(6R)-THF}]X^+HX^-$  auch bereits gelingen durch fraktionierte Kristallisation aus einem Lösungsmittel wie Ameisensäure unter Zusatz von Wasser oder auch ohne jeden Zusatz eines Kristallisationsmittels.

In der Regel kristallisiert die gewünschte (6R)-Verbindung zuerst aus; die diastereomere (6S)-Verbindung reichert sich in den Filtraten an. In einzelnen Fällen, z.B. wenn man das innere Salz von 5,10-CH-(6R,S)-THF aus Ameisensäure/Wasser oder wenn man das  $[5,10\text{-CH-(6R,S)-THF}]^+$  Trichloracetat aus Dimethylsulfoxid kristallisiert, fällt dagegen zunächst das (6S)-Diastereomere aus, während man das (6R)-Diastereomere aus dem Filtrat isolieren kann.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht darin, dass man eine durch Formylierung von Folsäure zu 10-Formyl-folsäure und anschliessende katalytische Hydrierung und Dehydratisierung erhaltene Ameisensäure-Lösung, die (6R,S)-I in situ enthält, mit einer starken wässrigen Säure, z.B. Salzsäure, versetzt; dadurch kann das (6R)-Diastereomere in Form des Säureadditionssalzes der Formel  $(5,10\text{-CH-(6R)-THF})\text{X}\cdot\text{HX}$ , z.B. das entsprechende Chlorid-Hydrochlorid, zur Kristallisation gebracht werden.

Durch dieses Verfahren sind die (6S)-Tetrahydrofolate, insbesondere 5-CHO-(6S)-THF und 5-Me-(6S)-THF, sehr einfach und besonders wirtschaftlich zugänglich geworden.

Als physiologisch gut verträgliche Salze kommen in erster Linie in Betracht die Calcium-, Magnesium-, Natrium- und Kaliumsalze.

Die Magnesiumsalze zeichnen sich durch ihre verglichen mit den Calciumsalzen im allgemeinen erhöhten Wasserlöslichkeiten aus. Dies erlaubt bei ihrer Anwendung einen grösseren Dosisspielraum.

Es ist nicht erforderlich, 5,10-CH-(6R)-THF oder deren Säureadditionssalze vollständig von begleitender (6S)-Form zu befreien. Bei der Überführung durch Hydrolyse oder Reduktion in 5-CHO-(6S)-THF bzw. 5-Me-(6S)-THF und deren Isolierung wird jeweils die Restmenge an "falschem" Diastereomerem eliminiert.

### Beispiel 1 Calcium-5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolat

#### **1.1 Fraktionierte Kristallisation von 5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure [Anhydro-leucovorin; (6R,S)-I]**

Eine Lösung von 1000 g [5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure]chlorid $\cdot$ hydrochlorid $\cdot$ dihydrat ( $[5,10\text{-CH-(6R,S)-THF}]\text{Cl}\cdot\text{HCl}\cdot 2\text{ H}_2\text{O}$ ) in 2 lt Ameisensäure von 35 °C wird mit 300 ml 2 N Salzsäure versetzt, langsam auf 20 °C abgekühlt und kristallisieren gelassen. Nach einigen Stunden wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert und mit 2 N Salzsäure gewaschen. Man erhält (6R)-I mit einem Diastereomeren-Gehalt von 91,5% an  $[5,10\text{-CH-(6R)-THF}]\text{Cl}\cdot\text{HCl}$ , bestimmt mittels HPLC unter Verwendung einer chiralen Säule (Resolvosil-BSA-7).

$[\alpha]_D^{25} = +36^\circ$  (c = 1 in DMSO/2 N HCl 8:2)

#### **1.2 Überführung in Calcium-5-formyl-(6S)-tetrahydrofolat (Transformylierung)**

120 g des nach 1.1 erhaltenen Kristallisates werden in wässriger Natronlauge gelöst, einige Stunden bei pH 5,5 bis 6,5 schwach gekocht, abgekühlt und mit überschüssigem Calciumchlorid versetzt. Das ausgeschiedene Calciumsalz von 5-CHO-(6S)-THF wird aus Wasser umkristallisiert. Man erhält Calcium-5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolat $\cdot 5\text{ H}_2\text{O}$ . Gehalt an Ca-5-CHO-(6S)-THF  $\geq 99$  Flächen%, bestimmt mittels HPLC unter Verwendung einer chiralen Säule.

$[\alpha]_D^{25} = -15^\circ$  (bezogen auf wasserfreies Ca-Salz; c = 1,5% in Wasser).

### Beispiel 2 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure und Calcium 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolat

#### **2.1 Fraktionierte Kristallisation von in situ erhaltenem (6R,S)-I**

Eine Lösung, die durch katalytische Hydrierung von 10-Formyl-folsäure in Ameisensäure erhalten wurde, wird durch Eindampfen auf einen Gehalt von etwa 30-35 % konzentriert. Ein Gewichtsteil des Konzentrates wird bei 35 °C mit etwa 0,4 Gewichtsteilen konzentrierter (35%iger) Salzsäure versetzt. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen, lässt über Nacht bei 5-10 °C stehen, filtriert das ausgeschiedene Kristallisat ab und wäscht es mit wenig eiskalter Salzsäure und Aceton. Man erhält  $[5,10\text{-CH-(6R)-THF}]\text{Cl}\cdot\text{HCl}$ ; (6R)-Anteil: 90%.

#### **2.2 Rekristallisation von rohem $[5,10\text{-CH-(6R)-THF}]\text{Cl}\cdot\text{HCl}$**

Man löst 1,2 kg des nach 2.1 erhaltenen Kristallisats bei 35 °C in 3 lt Ameisensäure, versetzt mit 450

ml 2 N Salzsäure, kühlt allmählich auf Raumtemperatur ab und hält einige Stunden bei 0-5 °C. Das gebildete Kristallinat wird abfiltriert und mit verdünnter Salzsäure und Aceton gewaschen. Man erhält [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O mit einem (6R)-Anteil von 98 %.

5

### 2.3 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure [5-Me-(6S)-THF]

Man trägt 30 g des nach 2.2 erhaltenen [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O in eine Lösung von 25 g Natriumborhydrid und 3,4 g Tris in 300 ml Wasser ein und rührt über Nacht. Die erhaltene Lösung wird mit Salzsäure bis zum pH 4 angesäuert, wobei sich 5-Me-(6S)-THF als Dihydrat ausscheidet. Es wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen.

### 2.4 Calcium-5-methyl-(6S)-tetrahydrofolat

15

Die Hälfte des nach 2.3 erhaltenen 5-Me-(6S)-THF·2 H<sub>2</sub>O wird in möglichst wenig verdünnter Natronlauge gelöst, die Lösung wird mit Aktivkohle und Filterhilfsmittel behandelt, filtriert und mit überschüssigem Calciumchlorid versetzt. Das gebildete Calcium-5-methyl-(6S)-tetrahydrofolat-pentahydrat scheidet sich allmählich aus. Nach Kristallisieren lassen bei 0-3 °C wird das Produkt abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert.

20

$[\alpha]_D^{25} = +40^\circ$  (bezogen auf die wasserfreie Verbindung; c = 1,5% in Wasser).

Dieselbe Verbindung wird auch erhalten, wenn man das nach Beispiel 1,1 erhaltene [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl nach Beispiel 2.3/2.4 weiter umsetzt.

25

### Beispiel 3 Magnesium-5-methyl-(6S)-tetrahydrofolat

Die zweite Hälfte der nach Beispiel 2.3 erhaltenen 5-Me-(6S)-THF wird allmählich in der minimal erforderlichen Menge 2 N Natronlauge gelöst und mit einem Überschuss an Magnesiumchlorid versetzt. Durch Zusatz von Ethanol wird das Magnesiumsalz zur Kristallisation gebracht. Diese neue Verbindung ist gut wasserlöslich.

30

### Beispiel 4 [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl

35

#### 4.1 Fraktionierte Kristallisation von [5,10-CH-(6R,S)-THF]Cl·HCl aus Ameisensäure

Man löst 25 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O in 50 ml 35 °C warmer Ameisensäure, kühlt auf 0 °C ab und impft mit einer Spur von nach Beispiel 2.2 erhaltenem Produkt. Nach einigen Stunden wird das erhaltene [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl abfiltriert; (6R)-Anteil 79%. Durch erneutes Umkristallisieren steigt der (6R)-Anteil auf über 90 %.

40

#### 4.2 Selektive Kristallisation von [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl durch Zusatz von Wasser

45

Man löst 25 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O in 50 ml Ameisensäure bei 35 °C, versetzt mit 5 ml Wasser, kühlt auf 0 °C ab und impft mit authentischem (6R)-Isomerem. Nach Stehen über Nacht wird das erhaltene [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl abfiltriert; (6R)-Anteil: 86,5%.

50

#### 4.3 Selektive Kristallisation von [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl aus wässriger Salzsäure

Man löst 10 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O bei 50 °C in 90 ml konzentrierter Salzsäure, verdünnt mit 10 ml Wasser und impft gleichzeitig mit authentischem Material. [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O kristallisiert aus; 6R-Anteil: 87%.

55



**Beispiel 5 Herstellung des innern Salzes der 5,10-CH-(6R,S)-THF und von Salzen der 5,10-CH-(6R,S)-THF mit starken Säuren sowie von [5,10-CH-(6S)-THF]Br\*HBr**

**5.1 Inneres Salz der 5,10-CH-(6R,S)-THF**

Eine Lösung von 200 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]Cl\*HCl in 1000 ml Ameisensäure wird durch eine mit 1100 ml Anionenaustauscherharz (IRA-68) beschickte Säule perkoliert gelassen. Das Effluat wird unter vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wird in Ameisensäure gelöst und die Lösung in mehrere aliquote Teile aufgetrennt.

Ein Teil der Lösung wird mit Ethanol versetzt, wobei das innere Salz auskristallisiert. Es ist auffallend gelb gefärbt. Es ist in Wasser, organischen Lösungsmitteln und auch in polaren Lösungsmitteln mit Ausnahme von Ameisensäure sehr wenig löslich.

Das innere Salz von 5,10-CH-(6R,S)-THF kann auch erhalten werden, wenn man eine nach Beispiel 2.1 in situ erhaltene konzentrierte Lösung von 5,10-CH-(6R,S)-THF durch Zusatz eines niedrigen Alkohols, z.B. Ethanol, oder eines Ketons, z.B. Methylpropylketon, zur Kristallisation bringt.

**5.2 Salze von 5,10-CH-(6R,S)-THF mit starken Säuren**

Aliquote Teile der nach 5.1 erhaltenen Lösung werden mit einem Überschuss der gewünschten Säure in Ameisensäure versetzt und durch Zusatz von Ethanol gefällt. Die erhaltenen Salze werden abfiltriert.

Nach dieser Methode werden hergestellt:

- [5,10-CH-(6R,S)-THF]Br\*HBr,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]J\*HJ,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Phosphat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Sulfat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Nitrat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Oxalat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Maleinat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Toluol-4-sulfonat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Benzolsulfonat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Methansulfonat,
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Trichloracetat und
- [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Trifluoracetat.

**5.3 [5,10-CH-(6R)-THF]Br\*HBr**

Eine Lösung von 20 g innerem Salz der [5,10-CH-(6R,S)-THF] in 30 ml Ameisensäure wird mit etwas mehr als der berechneten Menge 6 N wässriger Bromwasserstoffsäure versetzt und bei 20-25° C gerührt. Nach einiger Zeit scheidet sich [5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure]bromid-hydrobromid aus; (6R)-Anteil: 89%.

[5,10-CH-(6R)-THF]Br\*HBr wird auch erhalten, wenn man [5,10-CH-(6R,S)-THF]Br\*HBr in Ameisensäure löst und 2 N wässrige Bromwasserstoffsäure zusetzt oder wenn man das "racemische" Bromid-hydrobromid aus wenig Dimethylsulfoxid (etwa 4 ml pro g) fraktioniert kristallisiert.

Bei den Säureadditionssalzen mit Halogenwasserstoffsäuren, Salpetersäure, Schwefel- und Sulfonsäuren können zwei Säureäquivalente pro Mol 5,10-CH-THF an der Salzbildung beteiligt sein. Bei den Salzen mit mittelstarken Säuren, z.B. Maleinsäure, ist jeweils nur ein Säureäquivalent in Salzform gebunden.

**Beispiel 6 [5,10-CH-(6R)-THF]J\*HJ**

Diese Verbindung wird analog Beispiel 5 hergestellt.

**Beispiel 7 [5,10-CH-(6R)-THF]-Phosphat**

Man löst 30 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Phosphat, hergestellt nach Beispiel 5, bei 50 °C in 80 ml Dimethylsulfoxid und rührt einige Stunden bei Raumtemperatur. Nach längerer Zeit kristallisiert [5,10-CH-(6R)-THF]-Phosphat aus, welches abfiltriert und getrocknet wird.

6R-Isomerenanteil: 70% (HPLC).

- 5 [5,10-CH-(6R)-THF]-Phosphat wird auch erhalten, wenn man eine Lösung des racemischen Phosphats in Ameisensäure mit einer geringen Menge von 2 M wässriger Phosphorsäure versetzt.

#### Beispiel 8 [5,10-CH-(6R)-THF]-Maleinat

10

Man löst 30 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Maleinat bei 50 °C in 125 ml 1-Methyl-2-pyrrolidon und rührt anschliessend bei Raumtemperatur. Das nach langer Zeit ausgeschiedene [5,10-CH-(6R)-THF]-Maleinat wird abfiltriert; R-Anteil: 78%.

15

#### Beispiel 9 [5,10-CH-(6R)-THF]-Toluol-4-sulfonat

Man löst 15 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Toluol-4-sulfonat bei 40-50 °C in 28 ml Ameisensäure, versetzt mit 100 ml Wasser und rührt anschliessend bei Raumtemperatur. Das ausgeschiedene [5,10-CH-(6R)-THF]-Toluol-4-sulfonat wird abfiltriert; 6R-Anteil: 85% (HPLC).

20

[5,10-CH-(6R)-THF]-Toluol-4-sulfonat wird auch erhalten, wenn man die R,S-Verbindung aus 1-Methyl-2-pyrrolidon (etwa 4-6 ml/g) oder Dimethylacetamid oder Dimethylsulfoxid (jeweils etwa 2-3 ml/g) umkristallisiert.

25

#### Beispiel 10 [5,10-CH-(6R)-THF]-Trichloracetat

Eine Lösung von 10 g [5,10-CH-(6R,S)-THF]-Trichloracetat in 50 ml Dimethylsulfoxid wird während einiger Stunden gerührt und anschliessend filtriert. Der Filtrückstand besteht stark überwiegend aus [5,10-CH-(6S)-THF]-Trichloracetat. Das Filtrat wird mit Wasser oder Ethanol versetzt, worauf sich [5,10-CH-(6R)-THF]-Trichloracetat ausscheidet; 6R-Anteil: 70% (HPLC).

30

#### Beispiel 11 Inneres Salz der 5,10-CH-(6S)-THF und der 5,10-CH-(6R)-THF

35

Eine Lösung von 10 g innerem Salz der 5,10-CH-(6R,S)-THF in 20 ml Ameisensäure wird mit 50 ml Wasser versetzt und 17 Stunden bei 20 °C gerührt.

Das ausgeschiedene Kristallisat wird abfiltriert. Es besteht vorwiegend aus dem inneren Salz der 5,10-CH-(6S)-THF. Gehalt an 6S-Form: 73%. Durch Wiederholung der Operation wird der Gehalt an 6S-Form auf 90% gesteigert. Die Mutterlauge wird mit Aceton versetzt, worauf sich ein zweites Kristallisat ausscheidet. Es wird abfiltriert und untersucht. Es besteht zu 75% aus dem inneren Salz von 5,10-CH-(6R)-THF.

40

#### Beispiel 12 [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl

45

Eine Lösung von 100 g innerem Salz der 5,10-CH-(6R,S)-THF in 200 ml Ameisensäure wird mit 500 ml Wasser versetzt und 20 Stunden gerührt. Das ausgeschiedene innere Salz der 5,10-CH-(6S)-THF wird abfiltriert. Das Filtrat wird mit starker Salzsäure versetzt, oder HCl-Gas wird in das Filtrat eingeleitet. Die allmählich entstehende Ausscheidung besteht aus [5,10-CH-(6R)-THF]Cl·HCl·2 H<sub>2</sub>O mit einem Gehalt an 6R-Form von 95%.

50

#### Beispiele 13-18

55 In ähnlicher Weise wie in den Beispielen 5 bis 12 beschrieben lassen sich herstellen:

13. [5,10-CH-(6R)-THF]-Nitrat,
14. [5,10-CH-(6R)-THF]-Sulfat,
15. [5,10-CH-(6R)-THF]-Oxalat,

16. [5,10-CH-(6R)-THF]-Methansulfonat,
17. [5,10-CH-(6R)-THF]-Benzolsulfonat,
18. [5,10-CH-(6R)-THF]-Trifluoracetat.

5

## Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von 5,10-Methenyl-(6R)-, 5-Formyl-(6S)- und/oder 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man 5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure, dessen inneres Salz und/oder eines ihrer Salze mit starken Säuren einer Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation unterzieht und, falls erwünscht, die erhaltene 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure durch Behandeln mit einem hydrolysierenden Mittel in 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder durch Behandeln mit einem reduzierenden Mittel in 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure umwandelt und/oder eine erhaltene freie Säure durch Behandeln mit einer Base in eines ihrer Salze überführt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation in mindestens einem polaren Lösungsmittel durchführt.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man für die fraktionierte Kristallisation als Lösungsmittel ein polares organisches Lösungsmittel und als Kristallisationsmittel eine wässrige Mineralsäure oder Wasser oder als Lösungsmittel eine konzentrierte wässrige Mineralsäure und als Kristallisationsmittel Wasser verwendet.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Lösungsmittel Ameisensäure und als Kristallisationsmittel eine wässrige starke Säure verwendet.
5. Verwendung von nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4 hergestellter 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure zur Herstellung von 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure durch Hydrolyse.
6. Verwendung von nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4 hergestellter 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure zur Herstellung von 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure durch Reduktion.
7. 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure sowie ihre Salze hergestellt nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4.
8. 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie ihre Salze hergestellt nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4.
9. 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie ihre Salze hergestellt nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4.
10. Calciumsalz der 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure.
11. Magnesiumsalz der 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure.
12. Inneres Salz der 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure sowie [5,10-CH-(6R)-THF]-Phosphat, -Nitrat, -Sulfat, -Toluolsulfonat, -Benzolsulfonat, -Methansulfonat, -Oxalat, -Maleinat und -Trichloracetat.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat:

1. Verfahren zur Herstellung von 5,10-Methenyl-(6R)-, 5-Formyl-(6S)- und/oder 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man 5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure, dessen inneres Salz und/oder eines ihrer Salze mit starken Säuren einer Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation unterzieht und, falls erwünscht, die erhaltene 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure durch Behandeln mit einem hydrolysierenden Mittel in 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder durch Behandeln mit einem reduzierenden Mittel in 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure umwandelt und/oder eine erhaltene freie Säure durch Behandeln mit einer Base in eines ihrer Salze überführt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation in mindestens einem polaren Lösungsmittel durchführt.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man für die fraktionierte Kristallisation als Lösungsmittel ein polares organisches Lösungsmittel und als Kristallisationsmittel eine wässrige Mineralsäure oder Wasser oder als Lösungsmittel eine konzentrierte wässrige Mineralsäure und als Kristallisationsmittel Wasser verwendet.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Lösungsmittel Ameisensäure und als Kristallisationsmittel eine wässrige starke Säure verwendet.
5. Verwendung von nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4 hergestellter 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure zur Herstellung von 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure durch Hydrolyse.
6. Verwendung von nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2, 3 oder 4 hergestellter 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure zur Herstellung von 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure durch Reduktion.

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 348 641 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89108451.9

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C07D 475/04**

(22) Anmeldetag: 11.05.89

(30) Priorität: 29.06.88 DE 3821875

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
03.01.90 Patentblatt 90/01

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(86) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 24.04.91 Patentblatt 91/17

(71) Anmelder: **EPROVA Aktiengesellschaft**  
**Im Laternenacker 5**  
**CH-8200 Schaffhausen(CH)**

(72) Erfinder: **Müller, Hans Rudolf**  
**Beckenwäldli 18**  
**CH-8207 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Ulmann, Martin**  
**Steigstrasse 339**  
**CH-8447 Dachsen(CH)**  
Erfinder: **Conti, Josef**  
**Winkelriedstrasse 22**  
**CH-8203 Schaffhausen(CH)**  
Erfinder: **Mürdel, Günter**  
**vor Hegin**  
**W-7708 Tengen-Büßlingen(DE)**

(54) Verfahren zur Herstellung von Tetrahydrofolaten.

(57) Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von 5,10-Methenyl-(6R)-, 5-Formyl-(6S)- und/oder 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure sowie von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Säureadditionssalz oder das innere Salz von 5,10-Methenyl-(6R,S)-tetrahydrofolsäure einer Diastereomerentrennung durch fraktionierte Kristallisation unterzieht und, falls erwünscht, die erhaltene 5,10-Methenyl-(6R)-tetrahydrofolsäure durch Behandeln mit einem hydrolysierenden Mittel in 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure oder durch Behandeln mit einem reduzierenden Mittel in 5-Methyl-(6S)-tetrahydrofolsäure umwandelt und/oder eine erhaltene freie Säure durch Behandeln mit einer Base in eines ihrer Salze überführt.

EP 0 348 641 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 8451

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE   |   |   |  |
|--|---|---|--|
| Kategorie  | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch                         | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5) |
| D,A  | US-A-2 688 018 (D.B. COSULICH)<br>* Insgesamt *                                     | 1   | C 07 D 475/04                            |
| D,A  | EP-A-0 266 042 (UNIVERSITY OF STRATHCLYDE)<br>* Insgesamt *                         | 1   |  |
| P,A  | EP-A-0 293 029 (EPROVA)<br>* Insgesamt *  | 1   |  |
|  |   |   | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)    |
|  |   |   | C 07 D 475/00                            |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt  |   |   |  |
| Recherchenort<br>DEN HAAG  |   | Abschlußdatum der Recherche<br>14-02-1991 | Prüfer<br>LUYTEN H.                      |
| <b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b><br>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br>A : technologischer Hintergrund<br>O : nichtschriftliche Offenbarung<br>P : Zwischenliteratur<br>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument<br>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument |   |   |  |

EPO FORM 1503 (01.82) (P0403)